

UNTERSUCHUNGEN ZUM
GASCHROMATOGRAPHISCHEN
NACHWEIS VON 6-MERCAPTOPURIN
IM SERUM VON
NIERENTRANSPLANTATIONS-
PATIENTEN, DIE MIT AZATHIOPRIN
BEHANDELT WURDEN

Hans-Joachim Wypior

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548318_0009

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Spann

UNTERSUCHUNGEN ZUM GASCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEIS VON
6-MERCAPTOPURIN IM SERUM VON NIERENTRANSPLANTATIONS-
PATIENTEN, DIE MIT AZATHIOPRIN BEHANDELT WURDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Joachim Wypior
aus
Schwandorf
1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1981



Herrn Prof. Dr. med. W. Spann gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. med. W. Land danke ich für die Überlassung seiner Patienten.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich den Herren Dres. L. von Meyer und A. Schilling für stete Hilfsbereitschaft und für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Organtransplantationen	1
1.2. Geschichte	1
1.3. Immunsuppressive Substanzen	2
2. Pharmakokinetik von Azathioprin	4
2.1. Stoffwechsel	4
2.2. Mechanismus	5
2.3. Anwendung und Nebenwirkungen	6
2.4. Beziehungen zwischen therapeutischer und toxischer Dosis	6
2.5. Nierenfunktion und Immunsuppression	7
3. Nachweis des Azathioprinmetaboliten 6-Mercaptopurin im Serum	8
3.1. Literaturübersicht	8
3.2. Wertung der Literaturübersicht	9
3.3. Eigene Versuche zum Nachweis von 6-Mercaptopurin im Serum	11
3.3.1. Versuche zur Derivatisierung des 6-Mercaptopurin	11
3.3.2. Versuche zur Extraktion des 6-Mercaptopurin	11
3.3.2.1. XAD-Harz	11
3.3.2.2. Extrelut ^R -Fertigsäule	12
3.3.2.3. Dowex-Ionenaustauschharz	13
3.3.3. Beschreibung der entgültig erarbeiteten Methode	14
4. Ergebnisse	20
4.1. Identifizierung der Substanzen auf dem Chromatogramm	20
4.2. Eichkurve	22
4.3. Ausbeute und Genauigkeit (Standardabweichung)	22

	Seite
4.4. Ergebnisse des untersuchten Patientenblutes	24
5. Arbeitsvorschriften	30
6. Diskussion	37
7. Zusammenfassung	39
8. Literaturverzeichnis	41

1. Einleitung

1.1. Organtransplantationen

Organtransplantationen waren von jeher ein Traum der modernen Medizin. Dieses Teilgebiet der Medizin erreichte jedoch erst in diesem Jahrhundert ein entsprechendes Niveau, so daß man speziell bei Nierentransplantationen von einer Routineoperation sprechen kann. Es wurden auch mit Hornhaut- und Gehörknöchelchentransplantationen Erfolge erzielt. Die Forschung der Zukunft muß sich mit der Weiterentwicklung des erreichten Standes, vor allem der immunsuppressiven Therapie, sowie mit den Arbeiten an der Verpflanzung von Pankreas, Leber, Lunge und Herz befassen.

Das wichtigste Problem bei einer Organtransplantation ist die Organerhaltung. Bis heute wurden über 30000 Nierentransplantationen in aller Welt durchgeführt (32). Dabei ist festzustellen, daß insbesondere die Überlebenszeit der transplantierten Patienten entscheidend verbessert wurde. Die Letalitätssrate konnte von über 30% auf unter 10% gesenkt werden. An unserem Zentrum in München im Klinikum Großhadern konnte in einer Serie von über 60 Transplantationen kein unmittelbar transplantationsbedingter Todesfall beobachtet werden (32). Entscheidend ist hierbei eine bessere Auswahl der Patienten, die für einen solchen Eingriff in Frage kommen, wobei die Gewebetypisierung von Spender und Empfänger zu nennen ist, obwohl deren Nutzen nicht unbestritten ist (32). Ein weiterer wichtiger Faktor neben der Patientenselektion ist die Immunsuppression, von der das Gelingen einer Organtransplantation abhängt. Auf sie soll in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk gerichtet sein.

1.2. Geschichte

Frühe Tierexperimente auf dem Gebiet der Organtransplantationen, die wenig erfolgreich waren, brachten die Erkenntnis, daß autologe Organe besser angenommen werden als homologe. Aber die genetischen Zusammenhänge wurden erst voll

erkannt, als 1926 WILLIAMSON (58) Daten veröffentlichte, die Auskunft gaben über die Überlebenszeiten nach autologen, homologen und heterologen Nierentransplantationen bei Hunden. Diese wurden durch die Experimente von BAUER (5) im nächsten Jahr erhärtet, als eine Hauttransplantation bei Zwillingen erfolgreich ausgeführt wurde. Aber erst 20 Jahre später wurde durch die Arbeiten von MEDAWER (38, 39, 40) die Basis Immunabwehr des Körpers gegen das Transplantat als fremdes, nicht körpereigenes Gewebe richtig erkannt.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden in den folgenden Jahren zahlreiche Nierentransplantationen unternommen, doch die Erfolgsquote war nahezu Null. Immunsuppression wurde in Form von Ganzkörperbestrahlung durchgeführt; 1968 und 1969 konnten HUME (34) und STARZL u. a. (54) immerhin berichten, daß einige Patienten überlebten und keine Abstoßungskrisen zeigten.

Im Jahre 1962 begann ein neuer, bis heute andauernder Abschnitt dieses Arbeitsgebietes der Medizin: die Entdeckung und Weiterentwicklung der chemischen Immunsuppression mittels Azathioprin und Kortikosteroiden.

1.3. Immunsuppressive Substanzen

Schon 1958/59 konnten SCHWARTZ u. a. (51) und SCHWARTZ und DAMESHEK (50) zeigen, daß der Antimetabolit 6-Mercaptopurin die Abwehrreaktion bei Kaninchen, die Rinderserumalbumin injiziert bekamen, unterdrückte. 1960/61 berichteten CALNE (7) und CALNE und MURRAY (10), daß 6-Mercaptopurin die Überlebenszeit von transplantierten Hundenieren verlängerte. 1962 kamen CALNE u. a. (9) mit ihren Arbeiten zu der Annahme, daß das beste Immunsuppressivum für menschliche Transplantationen Azathioprin (Imurek^R) sei. Dies wurde 1968 von MERRILL (42) bestätigt.

Andere Arbeiten über die immunsuppressive Wirkung von Kortikosteroiden von 1951 - 1964 von BILLINGHAM u. a. (6), MORGAN (46), MERRILL u. a. (43) und MARCHIORI u. a. (37) führten dazu, daß die Kombination Azathioprin und Prednison zur Un-

terdrückung der Immunabwehr bei Nierentransplantationen routinemäßig eingesetzt wurde.

In den nun folgenden Abschnitten soll zunächst auf die Pharmakokinetik des Azathioprin eingegangen werden, um die mit der immunsuppressiven Therapie verbundene Problematik und die Forderung nach einem für diese Therapie geeigneten Monitoring verständlich zu machen.

2. Pharmakokinetik von Azathioprin

Azathioprin (Imurek^R, Fa. WELLCOME, England) ist ein S-Imidazolderivat des 6-Mercaptopurin und wurde 1960/61 von ELION und Mitarbeitern entwickelt (19, 20).

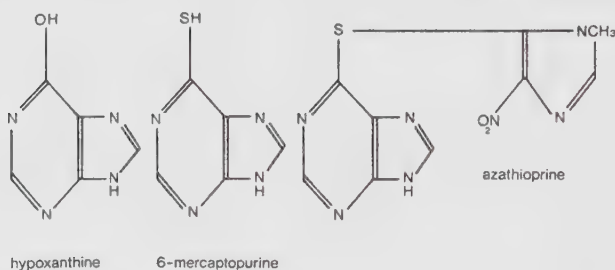


Abb. 1: Strukturformeln

2.1. Stoffwechsel

Azathioprin wird aus dem Gastrointestinaltrakt gut resorbiert: ELION zeigte, daß in 24 Stunden über 50% der radioaktiven Dosis von radioaktivmarkiertem ³⁵S-Azathioprin im Urin ausgeschieden werden, während in einer 48-Stunden Stuhlprobe nur 12,6% davon enthalten sind (17, 18). Die Ausscheidung im Urin von Azathioprin selber ist sehr gering, wenn es in therapeutischen Dosen verabreicht wird: weniger als 2% des ³⁵S-Azathioprin erscheinen unverändert im Urin, während etwa 10% des ³⁵S als 1-Methyl-4-nitro-5-thioimidazol (s. u.) im Urin ausgeschieden werden (17, 18, 21, 23).

Azathioprin wird in vivo umgebaut in 6-Mercaptopurin, hauptsächlich durch nukleophilen Angriff an der 5. Position des Nitroimidazolringes (25). Bei dieser Spaltung entsteht außerdem ein 5-Thioimidazol-Derivat (1-Methyl-4-nitro-5-thioimidazol), dem ebenfalls immunsuppressive Wirkung zugeschrieben wird (59). Dieser Vorgang geschieht in den roten Blutkörperchen, welche Glutathion und andere sulfhydrylhaltige Komponenten enthalten.

6-Mercaptopurin wird weiter abgebaut zu seiner biologisch wirksamen Form, zur Thioinosinsäure. Dieser Vorgang findet ebenfalls in den Blutzellen statt unter Mitwirkung von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Thioinosinsäure wird dann umgewandelt in andere biologisch aktive Nukleotide (z. B. Methylthioinosinsäure und Thioguanylsäure).

2.2. Mechanismus

Die Wirksamkeit des Antimetaboliten Azathioprin wird im wesentlichen auf die Freisetzung von 6-Mercaptopurin in den Zellen zurückgeführt. ELION, HITCHINGS und Mitarbeiter fanden, daß 6-Mercaptopurin als Analogon des Hypoxanthin ein spezifischer Antagonist desselben ist und deshalb als hervorragender Antimetabolit geeignet sei (24).

Die Aufklärung des Azathioprinstoffwechsels zeigte auf, daß das Ribonukleotid des Hypoxanthin, die Inosinsäure nicht nur das erste biosynthetische Purin, sondern auch der Mittelpunkt des gesamten Purinmetabolismus ist. 6-Mercaptopurin verhält sich wie Hypoxanthin und stört deshalb die natürlichen Reaktionen des Purinanabolismus. Es ist sowohl ein unphysiologisches Substrat, als auch ein kompetitiver Hemmstoff der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase. Diese bewirkt den Abbau von 6-Mercaptopurin zu Thioinosinsäure, welche ihrerseits den Umbau von Inosinsäure zu Adenylsäure als auch zu Guanylsäure hemmt. Durch diese Reaktionen wird die de-novo-Synthese von Purin und die RNS- und DNS- Synthese gehemmt, d. h. eine Immunantwort bleibt aus (59).

Azathioprin wurde als Weiterentwicklung des 6-Mercaptopurin entworfen, gleichsam als eine "maskierte Form", die das 6-Mercaptopurin erst am Zielort freigibt. HITCHINGS und ELION nehmen aber an, daß Azathioprin einen zusätzlichen Angriffsort haben muß. Vergleiche von Azathioprin und 6-Mercaptopurin in mehreren immunologischen Systemen zeigten auf, daß Azathioprin in einigen Fällen den besseren therapeutischen Index hat (33).

In einer weiterführenden Arbeit (59) wird berichtet, daß das

Enzym Methionin-Synthetase konzentrationsabhängig durch Azathioprin, nicht aber durch 6-Mercaptopurin gehemmt wird. Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselstellung im Vitamin B₁₂- und Folsäurestoffwechsel ein und wird zur DNS-Synthese benötigt. Da 6-Mercaptopurin keine entsprechende enzymchemische Wirkung zeigt, ist die Hemmung der Methionin-Synthetase wahrscheinlich auf das bei der Spaltung von Azathioprin entstehende Thioimidazolderivat zurückzuführen. Hierdurch kann die bereits oben erwähnte bevorzugte immunsuppressive Wirkung von Azathioprin gegenüber 6-Mercaptopurin erklärt werden.

2.3. Anwendung und Nebenwirkungen

Die optimale postoperative Dosis von Azathioprin ist die höchste, die der Patient toleriert ohne Nebenwirkungen zu zeigen. Es herrschen bei den verschiedenen Zentren unterschiedliche Meinungen darüber. Die Schwankungsbreite reicht von 1,5 bis 5 mg/kg Körpergewicht post operationem.

Die wichtigste toxische Erscheinung, die durch Azathioprin hervorgerufen wird ist die Knochenmarksdepression (1, 8) und damit verbunden Leukozytopenie und Thrombozytopenie. Dagegen wurden bei Menschen, die lange Zeit mit Azathioprin behandelt worden waren im Gegensatz zu Tieren weder Jejunalgeschwüre (15), noch Wachstumsstörungen bei Kindern gefunden (56). Lebertoxizität, die gelegentlich erwähnt wurde (42, 52) ist gewöhnlich reversibel, wenn das Medikament abgesetzt wird.

2.4. Beziehungen zwischen therapeutischer und toxischer Dosis

Das Verhältnis der einzelnen Azathioprinmetaboliten ist bei den jeweiligen Patienten verschieden und hängt vom verfügbaren Bestand an auf- und abbauenden Enzymen ab. Es wurde bereits aufgezeigt, daß das aktive immunsuppressive Agens einer oder mehrere dieser Metaboliten sind (s. o.); weiterhin wird vermutet, daß nun andere Metaboliten für die Toxizität von Azathioprin verantwortlich sind (22, 29). Die Kenntnis dieser Beziehungen ist notwendig für die Erstellung eines

Behandlungsschemas, das eine optimale Balance zwischen hoher Wirksamkeit und niedriger Toxizität beinhalten soll. Man kann sagen, daß Immunsuppression ohne Nebenwirkungen möglich ist; andererseits können auch schon Nebenwirkungen auftreten, ohne daß Immunsuppression erreicht wird (12). Die optimale Dosierung ist deshalb von Patient zu Patient verschieden. Da diese aber nicht exakt bestimmbar ist, müssen Kompromisse eingegangen werden.

2.5. Nierenfunktion und Immunsuppression

Obwohl der größte Teil des Azathioprin in den Blutzellen metabolisiert wird (25), werden geringe Mengen unverändertes Azathioprin und 6-Mercaptopurin im Urin ausgeschieden (16). Die Hauptmetaboliten, die im Urin ausgeschieden werden, nämlich Thioharnsäure und Sulphate haben keine immunsuppressive Wirkung (11, 16). Man müßte deshalb annehmen, daß verminderte Nierenfunktion keinen Effekt auf die immunsuppressive Wirkung und die Toxizität hätte. Dies waren auch die Ergebnisse der Forschungen von BACH und DARDENNE (1).

Im Gegensatz dazu stehen die klinischen Untersuchungen von STARZL (52, 55), CALNE (8) und LAND und SCHILLING (35). Sie zeigten, daß die Knochenmarkstoxizität bei Nierentransplantationspatienten mit verminderter Nierenfunktion größer war, als bei Patienten mit funktionierenden Organen. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten MICHAEL u. a. (45) von Patienten mit Glomerulonephritis während immunsuppressiver Behandlung. STARZL (53) kam deshalb zu dem Schluß, daß der "renal pathway of detoxification" von Azathioprin nicht besteht wenn die Nierenfunktion eingeschränkt ist. Die notwendige Konsequenz wäre es nun, die Dosis zu verringern. Einige Autoren halten sich daran bei akuter oder chronischer Niereninsuffizienz (35, 47, 60), andere jedoch nicht (30). Das Maß für die Beurteilung der vorliegenden Situation sind die Kreatininclearance und die Leukozytenzahl, welche jedoch beide ziemlich unspezifische Parameter sind.

3. Nachweis des Azathioprinmetaboliten 6-Mercaptopurin im Serum

3.1. Literaturübersicht

Die obigen Ausführungen sollten verständlich machen, warum es erstrebenswert ist einen Serumnachweis eines Azathioprinmetaboliten wie ihn 6-Mercaptopurin darstellt zu erarbeiten, mit dessen Hilfe man die immunsuppressive Therapie überwachen kann. Damit wäre uns ein Hilfsmittel gegeben, mit welchem man Aussagen über mögliche Knochenmarksschädigungen in Relation zum Serumspiegel machen könnte, ähnlich wie man z. B. in der Antitumorthherapie mit Arabinosylcytosin, Methotrexat oder Cyclophosphamid den Antitumoreffekt mit dem Blutspiegel in Korrelation setzen kann (4). Leider wird auf diesem Gebiet in der Literatur nur sehr wenig beschrieben.

HAMILTON und ELION verabreichten ^{35}S -6-Mercaptopurin um später die Radioaktivität im Plasma zu bestimmen (31).

LOO u. a. beschrieben eine quantitative Methode, bei der sie mit Hilfe von Bratton-Marshall-Reagens gebildeten Azofarbstoff farbphotometrisch nachwiesen (36).

FINKEL oxidierte 6-Mercaptopurin mit Kaliumpermanganat zu Purin-6-sulphonat und bestimmte dieses fluorimetrisch (27).

COFFEY u. a. versuchten 6-Mercaptopurin mit einem UV-Spektrometer nach Säulenchromatographie nachzuweisen (14).

CERRI und MAFFI bestimmten 6-Mercaptopurin mittels Dünnschichtchromatographie (13).

Eine Alternative hierzu bietet der Rosetteninhibitionstest, beschrieben von BACH u. a. (3). Dieser Test benützt Schaferythrozyten und Milzzellen nicht immunisierter Mäuse, und ist eine geeignete in vitro Methode die immunsuppressive Aktivität der verschiedenen aktiven Azathioprinmetaboliten nachzuweisen. Der Test basiert auf der Unterdrückung spontaner Rosettenbildung (rosette inhibitory activity = RIA). Man fand heraus, daß nach i. v. oder p. o. Applikation von Azathioprin RIA nach 30 Minuten im Serum auftritt und nach 60 Minuten das

Maximum erreicht. Dann fällt es schnell wieder ab, 50% verschwinden nach vier Stunden (2).

Eine weitere quantitative Nachweismethode von 6-Mercaptopurin im Serum wird von BAILEY u. a. (4) beschrieben. Bei dieser Methode wird eine Serumprobe mit Dithioerythrit versetzt und mit Ammoniumkarbonat gesättigt. 6-Mercaptopurin wird nun mittels Isopropanol-Äthylacetat (1:1), welches 0,1% Äthanthiol enthält aus dem Serum extrahiert. Nach Verdampfen der extrahierten Lösung wird der Rückstand in angesäuerter Kochsalzlösung aufgenommen, mit Chloroform gewaschen und mit Äthylacetat erneut extrahiert. 6-Mercaptopurin wird dann mit Trimethylaniliniumhydroxid derivatisiert und gaschromatographisch gemessen.

3.2. Wertung der Literaturübersicht

Eine Wertung der von HAMILTON und ELION (31), LOO u. a. (36), FINKEL (27) und COFFEY u. a. (14) beschriebenen Methoden findet man in der Arbeit von BAILEY u. a. (4). Hier wird diskutiert, daß diese Nachweismethoden Spezifität und eine ausreichende Nachweisgrenze vermissen lassen, so daß sie für unsere Belange als insuffizient erscheinen.

Bei diesen Methoden muß vor allem die Frage gestellt werden, ob wirklich nur das 6-Mercaptopurin im Plasma bzw. Serum bestimmt wird, oder ob nicht auch andere Stoffwechselprodukte in die chemische Reaktion mit einbezogen werden und so die Ergebnisse verfälschen. Dies ist besonders bei den beiden erstgenannten Arbeiten in Betracht zu ziehen.

Etwas anders verhält es sich mit der von CERRI und MAFFI (13) beschriebenen Nachweismethode mittels Dünnschichtchromatographie. Hier läßt sich zwar eine qualitative Abtrennung des 6-Mercaptopurin von anderen im Serum gelösten Stoffen erzielen, jedoch war eine quantitative Analyse auf diese Weise nicht möglich. Die 6-Mercaptopurinbande auf dem Dünnschichtchromatogramm wurde in Methanol gelöst und mit Trimethylaniliniumhydroxid derivatisiert, doch ließ sich gaschromatographisch kein dem 6-Mercaptopurin entsprechender Peak nachweisen.

Der Rosettentest von BACH u. a. (3) stützt sich auf biologische Methoden und macht Aussagen über die immunsuppressive Aktivität von Azathioprin. Man erhält allerdings keine konkreten Serumspiegel, weshalb diese Methode für unsere Ziele wenig geeignet erscheint. Aber gerade auf den Serumspiegel kommt es uns an, da wir eine mögliche Schädigung des Knochenmarks in eine Beziehung zur Höhe des Serumspiegels setzen wollen.

Die einzige quantitative Nachweismethode von 6-Mercaptopurin im Serum, die zumindest teilweise einsetzbar erscheint, wird von BAILEY u. a. (4) beschrieben. Sie war jedoch nach der angegebenen Vorschrift nicht durchführbar, da sie sich als viel zu zeitaufwendig erwies und wie die übrigen Methoden eine entsprechend niedrige Nachweisgrenze vermissen ließ. Sie konnte aber an einigen Punkten abgeändert werden, so daß sie an Durchführbarkeit gewann und für unsere Zwecke brauchbare Ergebnisse lieferte. Darauf soll in den nun folgenden Abschnitten ausführlich eingegangen werden.

3.3. Eigene Versuche zum Nachweis von 6-Mercaptopurin im Serum

3.3.1. Versuche zur Derivatisierung des 6-Mercaptopurin

Erste Versuche zeigten, daß es nicht möglich ist in Methanol gelöstes 6-Mercaptopurin direkt gaschromatographisch nachzuweisen. Im Chromatogramm konnten keine Unterschiede zwischen Leerwert und Probe festgestellt werden. Es war deshalb notwendig, 6-Mercaptopurin in ein Derivat zu überführen, welches sich leichter verdampfen und so gaschromatographisch messen ließ.

Zunächst wurde eine Veresterung mit Propionsäureanhydrid unter Zusatz von Pyridin angestrebt (Arbeitsvorschrift 1). Es konnte jedoch ebenso wie bei der oben beschriebenen direkten Gaschromatographie kein Peak aufgefunden werden. Als Säulenmaterial wurde Ultrabond verwendet, die Laufzeit der Proben betrug 30 Minuten.

Es wurde nun versucht, eine Methylierung von 6-Mercaptopurin mit Trimethylaniliniumhydroxid zu erreichen (Vorschrift 2). Gaschromatographisch konnte bei der Probe im Gegensatz zum Leerwert ein Peak bei etwa 3.50 Minuten identifiziert werden. Hierbei dürfte es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um das methylierte Derivat des 6-Mercaptopurin handeln.

Um im Einspritzblock des Gaschromatographen eine möglichst optimale Derivatisierung zu erlangen, wurde eine mit Trimethylaniliniumhydroxid versetzte Probe bei unterschiedlichen Einspritztemperaturen gemessen, wobei diese im Bereich zwischen 200 und 300 °C jeweils um 10 °C gesteigert wurden. Die am besten auswertbaren Peaks ergaben sich bei 300 °C, d. h. hier erfolgte die vollständigste Derivatisierung.

3.3.2. Versuche zur Extraktion von 6-Mercaptopurin

3.3.2.1. XAD-Harz

Nachdem das Problem der Derivatisierung gelöst war, mußte nun eine geeignete Extraktionsmethode für 6-Mercaptopurin gefunden werden. Die ersten Versuche verwendeten XAD-4 Harz

als Adsorbens und Methanol bzw. Äthylacetat-dichloräthan als Eluationsmittel (Vorschrift 3). Diese Experimente brachten keine positiven Ergebnisse, d. h. 6-Mercaptopurin konnte auf dem Gaschromatogramm nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies durch mangelnde Absorption des 6-Mercaptopurin an das Harz, oder aber durch andere Verluste der Substanz während der Arbeitsgänge, so z. B. durch Wandabsorption der Reaktionsgefäße bedingt. Auf dieses Problem soll später genauer eingegangen werden.

3.3.2.2. Extrelut^R-Fertigsäule

Eine Extraktion unter Verwendung von Extrelut^R-Fertigsäulen wurde nun angestrebt. Das Prinzip ist dabei folgendes: Die Probe wird auf eine mit körnigem Trägermaterial gefüllte Säule gegeben. Sie verteilt sich als stationäre Phase auf der trockenen porösen Matrix. Mit einem organischen Eluationsmittel werden dann die lipophilen Substanzen quantitativ aus der stationären Phase extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Lösung kann auf pH 1 bis pH 13 eingestellt werden. Damit ist eine optimale Extraktion gewährleistet. Diese Methode bringt viele Vorteile: Ersparnis an Zeit, Material und Lösungsmittel. Die Eluate sind reiner und müssen nicht mehr getrocknet werden. Die Handhabung ist einfach, die Ausbeute beträgt 80 bis 95% (48).

Diese Methode wurde zunächst für wässrige Lösungen von 6-Mercaptopurin erprobt. Als Eluationsmittel wurden Methanol bzw. Äthylacetat-dichloräthan verwendet (Vorschrift 4a). Die mit Methanol extrahierte Lösung zeigte auf dem Chromatogramm einen Peak, der dem einer direkt methylierten 6-Mercaptopurin-Lösung identisch war. Im Gegensatz dazu konnte dieser Peak bei dem anderen Eluationsmittel nicht gefunden werden, was daraus schließen läßt, daß von diesen beiden Eluationsmitteln nur Methanol zur Extraktion geeignet ist (Abb. 2). Es wurde nun dazu übergegangen 6-Mercaptopurin aus antikoaguliertem Vollblut, welchem die Substanz zugesetzt worden war zu extrahieren. Als Eluationsmittel wurde Methanol verwendet (Vorschrift 4b). Methanol erwies sich jedoch für Vollblut als ungeeignet, da das Hämoglobin nicht in der Säule zu-

rückgehalten, sondern mit dem Eluat ausgewaschen wurde. Als weitere Varianten wurden die in Vorschrift 4b aufgeführten Eluationsmittel erprobt. Diese verhinderten zwar, daß Hämoglobin ausgewaschen wurde, das Chromatogramm zeigte jedoch keinen Peak.

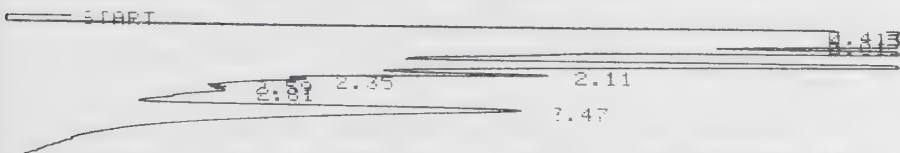


Abb. 2a: Extraktion von 6-Mercaptopurin mit Methanol:
3.47 entspricht der extrahierten Substanz.

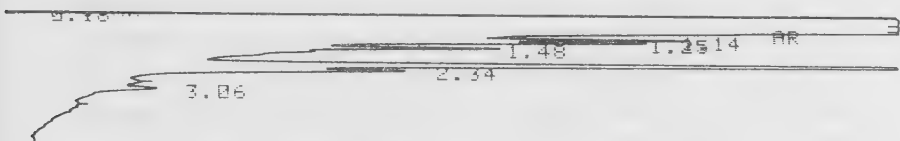


Abb. 2b: Extraktion mit Äthylacetat-dichloräthan:
bei 3.47 kein entsprechender Peak zu finden.

3.3.2.3. Dowex-Ionenaustauschharz

Bei einem weiteren Versuch 6-Mercaptopurin zu extrahieren wurde Dowex-Kationenaustauschharz verwendet (Vorschrift 5). Auch hier konnte bei der Gaschromatographie kein dem 6-Mercaptopurin entsprechender Peak gefunden werden. Spektrophotometrische Messungen der extrahierten Lösung brachten ebenso kein Ergebnis, während 6-Mercaptopurin direkt gelöst in 25%-igem Ammoniak gegen reinen 25%-igen Ammoniak im Spektrophotometer bei 315 nm ein Maximum zeigte. Es muß also bei den Arbeitsgängen zu einem Verlust der Substanz gekommen sein.

3.3.3. Beschreibung der entgültig erarbeiteten Methode

Die oben aufgeführten Versuche zeigen die Schwierigkeiten auf, mit denen eine Extraktion von 6-Mercaptopurin aus Serum bzw. Vollblut verbunden ist. Aufbauend auf einer 1975 von BAILEY u. a. (4) veröffentlichten Arbeit wurde nun eine Methode entwickelt, welche es ermöglicht 6-Mercaptopurin im Serum nachzuweisen (Vorschrift 6) und eine Eichkurve aufzustellen.

Das Hauptproblem der bisherigen Versuche lag darin, daß bei der Extraktion der Substanz ein regelmäßiger Verlust an 6-Mercaptopurin erfolgte bzw. das jeweilige Eluationsmittel nicht geeignet erschien. Dieser Verlust wird bedingt durch Wandabsorption, die sich besonders bei niedrigen Konzentrationen der Substanz sehr störend bemerkbar macht. Es ist also ein sogenannter Wandschutz notwendig, der verhindert, daß sich zuviel Substanz an der Innenwand der Reagenzgläser festsetzt und auf diese Weise bei der Extraktion verloren geht.

WALLE u. a. (57) beschrieben einen Wandschutzeffekt durch alkoholische Gruppen; der Zusatz dieser polaren Gruppen verhindert, daß polare Substanzen, wie z. B. Antihistaminika aus unpolaren Lösungsmitteln vom Glas absorbiert werden. Diese alkoholischen Gruppen waren jedoch für 6-Mercaptopurin nicht ausreichend, so daß die unangenehm zu handhabenden SH-Gruppen in Form von Dithioerythrit und Äthanthiol verwendet werden mußten.

Die weitere Bedeutung dieser SH-Gruppen liegt im Schutz vor Zersetzung des 6-Mercaptopurin während der Extraktionsvorgänge. Dieses Phänomen wird in der Arbeit von BAILEY u. a. (4) aufgezeigt: Abb. 3 zeigt zwei Gaschromatogramme von Serumextraktionen von 6-Mercaptopurin. In beiden Analysen betrug die Konzentration 5 µg/ml. Läßt man nun das Dithioerythrit (DTE) und das Äthanthiol bei der Extraktion weg, ist die Höhe der Peaks, speziell von 6-Mercaptopurin deutlich verringert; bei diesen hohen Konzentrationen ist dies bedingt durch Zersetzung der Substanz, weniger durch Wandhaftung.

Eigene Versuche brachten ähnliche Ergebnisse. Serumextraktio-

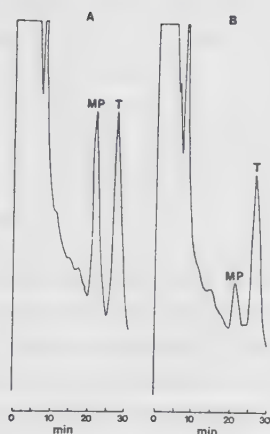


Abb. 3: Gaschromatogramme einer Serumextraktion von 6-Mercaptopurin (MP) und dem Standard Theophyllin (T).

A: Mit Zusatz von DTE und Äthanthiol.

B: Ohne Zusatz von DTE und Äthanthiol.

Abb. Übernommen aus (4).

nen wurden mit und ohne Zusatz von SH-Gruppen durchgeführt und anschließend dünnschichtchromatographisch in Butanol-Essigsäure-Wasser 25 : 4 : 10 (4) getrennt. Dabei zeigten sich bei der Extraktion ohne Schutzsubstanzen vier Banden im UV-Licht, während bei Verwendung von DTE und Äthanthiol nur eine einzige Bande verifiziert werden konnte.

Durch die Verwendung der SH-Gruppen konnte das Problem der Wandhaftung und der Instabilität des 6-Mercaptopurin während der Extraktionsvorgänge gelöst werden. Der Zusatz von DTE allein würde genügend Schutz im Serum und in den organischen Lösungen bieten, während dieser durch Äthanthiol allein nicht gewährt wird, da es seine Schutzwirkung nur in der Äthylacetatlösung zeigt. Durch die Verwendung von Äthanthiol gelingt es jedoch die zugesetzte Menge an DTE zu verringern und somit die Rückstände am Ende der Extraktion gering zu halten (4).

Ein weiteres Problem bei der Bestimmung von 6-Mercaptopurin betrifft seine Verdampfbarkeit bei der Gaschromatographie. Dies ist nicht direkt möglich. Es war deshalb erforderlich, ein Derivat zu schaffen, das diese Bedingung leichter erfüllt. Nachdem sich die Veresterung mit Propionsäureanhydrid als unbrauchbar erwies, konnte dies durch Methylierung mittels 0,2 M Trimethylaniliniumhydroxid in Methanol (TMAH) erreicht werden.

Auch BAILEY u. a. geben in ihrer Arbeit diese Methode an. Dabei hat sich gezeigt, daß die Methylierung im Alublock bei 135°C während 30 Minuten bessere Ergebnisse liefert als die Direktmethylierung im Einspritzblock des Gaschromatographen. Die Peaks sind hierbei konstanter und die Lösungsmittelfront geringer (4). Dies wurde auch mit eigenen Versuchen bestätigt.

Die folgenden Abschnitte sollen auf die Modifikationen eingehen, die die Durchführbarkeit und die Nachweisgrenze der Methode von BAILEY u. a. (4) entscheidend verbesserten. Es war nämlich nicht möglich nach der angegebenen Vorschrift rationell zu arbeiten und brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

BAILEY u. a. (4) fordern zu Beginn eine zweimalige Extraktion mit Isopropanol-Äthylacetat (1:1) aus dem Serum. Da dieser Schritt wegen des anschließenden Eindampfens sehr zeitraubend ist, wurde versucht eine einmalige Serumextraktion durchzuführen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen einmaliger und doppelter Extraktion. So konnte dieser Schritt verkürzt werden, was zur Durchführbarkeit der Methode entscheidend beitrug.

Zur weiteren Zeitersparnis wurde auf das radioaktive 6-Mercaptopurin als Standard für die Extraktionsphase verzichtet.

Die Angaben über den Reinigungsprozeß der extrahierten Lösung erwiesen sich als völlig insuffizient. Die drei geforderten "Waschprozeduren" sind bestenfalls für experimentelle Extraktionen aus wässriger Lösung ausreichend, nicht aber für Serumextraktionen. Es zeigte sich, daß 5 bis 8 Reinigungsgänge erforderlich sind, um einigermaßen Reinheit in der extrahierten Lösung zu erzielen. Diese manifestiert sich in

einer wasserklaren Lösung, die es gilt zu erzielen. Nach drei Reinigungsgängen ist die Probe noch dicht getrübt von Serumbestandteilen und nicht für eine weitere Verarbeitung geeignet.

Eine andere wichtige Änderung betrifft den internen Standard der Methode für die gaschromatographische Phase. Das in der Originalvorschrift angegebene Theophyllin erwies sich bei dem uns zu Verfügung stehenden Säulenmaterial als ungeeignet. Die eigenen Experimente zeigten, daß bei den Bedingungen, bei denen sich eine quantifizierbare Blutspiegelbestimmung durchführen ließ, eine Überlagerung der Peaks von 6-Mercaptopurin und Theophyllin stattfand, was BAILEY u. a. (4) anscheinend durch Anwendung des Säulenmaterials SE-30 vermieden. Sie senkten außerdem die Säulentemperatur auf 135°C, was eine weitere Trennung der Peaks erlaubte. Man erhielt dann zwei Peaks, deren Form uns für quantitative Bestimmungen höchst unbrauchbar erschien: die Peakbreite betrug bei einer Retentionszeit von 20 bzw. 25 Minuten fast 5 Minuten (Abb. 3). Eine exakte Auswertung des Chromatogramms war dabei nicht möglich.

Es war also ein Standard notwendig, der auf dem Chromatogramm eine dem 6-Mercaptopurin unterschiedliche Retentionszeit besitzt, jedoch bei Bedingungen, die eine schlanke symmetrische Peakform ergeben, d. h. hohe Säulentemperaturen des Gaschromatographen. Auf diese Weise ist es möglich exakt quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Arbeit von BAILEY u. a. (4) beschreibt eine Reihe von Substanzen, die sich als ungeeignet erwiesen haben: Purin, 2-Mercaptopurin, 6-Chloropurin, 8-Bromopurin, 6-Thioguanin, 6-Methylpurin, 2,6-Dithiopurin, 6-Methylmercaptapurin, 6-Methoxypurin, 8-Chloroxanthin und 6-Chloro-9-Methoxymethylpurin.

Als Alternative wurde deshalb ein Versuch mit Oxyäthyltheophyllin unternommen, der sich als erfolgreich erwies. Bei Säulentemperaturen von 220°C erhält man schlanke Peaks von 6-Mercaptopurin und Oxyäthyltheophyllin, die auch sauber voneinander getrennt waren (Retentionszeiten: 2 bzw. 3.60 Minu-

ten), so daß mit diesem Standard die geforderte Bestimmung möglich war. Der Standard wird vor der Derivatisierung des 6-Mercaptopurin zugegeben; auf diese Weise werden Volumenänderungen, bedingt durch die Arbeitsgänge, ziemlich gering gehalten.

Es wirft sich nun die Frage auf, ob der interne Standard durch coffein- bzw. theophyllinhaltige Substanzen, die sich bereits im Patientenblut befinden verfälscht wird. Eigene Versuche zeigten, daß Theophyllin bzw. Oxyäthyltheophyllin, das zu Beginn der Extraktion dem Serum zugesetzt wurde, vollständig entfernt wird und auf dem Chromatogramm nicht auftaucht. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch BAILEY u. a. (4); sie nahmen an, daß diese Substanzen in den Reinigungsgängen mit der Chloroformphase eliminiert werden.

Eine weitere Verbesserung der Methode konnte durch Verwendung eines anderen Säulenmaterials im Gaschromatographen erzielt werden. Statt des beschriebenen Trägermaterials SE-30 wurde 3% SP 2250 DA eingesetzt, und so eine verbesserte Peakform und Trennschärfe erreicht. Ähnlich brauchbare Ergebnisse lieferte auch 3% OV 1 + 0,1 BPC. Als weniger geeignet kristallisierten sich im Laufe der Versuchsreihen 3% OV 1, 2% OV 101, 3% OV 101, 5% OV 101 und 3% OV 17 heraus. Es konnten hiermit zwar auch auswertbare Peaks gewonnen werden, doch trat im Vergleich zum letztlich verwendeten Säulenmaterial Peak-tailing auf.

Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, daß bei den beiden erstgenannten Säulenmaterialien eine sogenannte Desaktivierung vorgenommen wurde. Das Säulenmaterial DA ist besonders für saure Substanzen, wie z. B. Barbiturate geeignet, während BPC für saure und alkalische Substanzen Anwendung findet. Da 6-Mercaptopurin trotz Derivatisierung sehr reaktionsfreudig ist, kommt es zu Radikalbildung. Diese Radikalbildung wird durch das Säulenmaterial DA bzw. BPC deaktiviert. Dies ist bei den anderen Säulenmaterialien nicht der Fall, so daß die Radikale mit dem Kieselgur der Säule reagieren können, was wiederum verfälschte Ergebnisse zur Folge hat.

Als weitere Modifizierung wurde statt eines Flammenionisationsdetektors (FID) ein Stickstoff-FID (N-FID) verwendet, der eine weitere Verbesserung der Selektivität und Empfindlichkeit der Methode erlaubte.

War in der Arbeit von BAILEY u. a. (4) die Nachweisgrenze mit 200 ng/ml angegeben, so konnte diese auf Grund der oben beschriebenen Änderungen entscheidend gesenkt werden. 50 ng/ml können noch einwandfrei quantifiziert werden, während die Nachweisgrenze bei etwa 20 bis 25 ng/ml liegt, was eine Steigerung um den Faktor 10 bedeutet. Spätere Untersuchungen zeigten, daß die Serumspiegel von 6-Mercaptopurin bei Patienten, die mit Azathioprin behandelt worden waren, zu einem großen Teil im Bereich zwischen 50 und 200 ng/ml liegen.

Zum Abschluß der Versuchsbeschreibung soll noch auf mögliche Fehlerquellen der beschriebenen Serumextraktionsmethode eingegangen werden. Zunächst einmal können Fehler in den Extraktionsgängen selbst liegen. Nur sorgfältigstes Arbeiten bringt bei der großen Anzahl von Arbeitsgängen, verbunden mit Reagenzglaswechsel zuverlässige Ergebnisse und schützt vor Substanzverlusten. Fehler können außerdem in den Reaktionslösungen liegen. Die äthanthiolhaltigen Lösungen sollten nie älter als zwei bis drei Monate sein und immer im Kühlschrank aufbewahrt werden, da sie sich leicht verflüchtigen. Dasselbe betrifft die Standardlösung Oxyäthyltheophyllin, welche allerdings länger haltbar ist. Bei Beachtung dieser Faktoren werden mit der beschriebenen Methode zuverlässige und exakte Ergebnisse erhalten, die in der Klinik eingesetzt werden können.

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung der Substanzen auf dem Chromatogramm

Zu diesem Zwecke wurden drei Lösungen zubereitet:

- a) 0,2 ml 6-Mercaptopurinlösung + 0,2 ml 0,01 M TMAH
- b) 0,2 ml Oxyäthyltheophyllinlösung + 0,2 ml 0,01 M TMAH
- c) a+b (ohne TMAH-Zusatz) eindampfen, in 0,2 ml Methanol auflösen und mit 0,2 ml 0,01 M TMAH versetzen

Die Derivatisierung erfolgte direkt im Einspritzblock des Gaschromatographen. Die Chromatogramme dieser Lösungen erlauben nun die Zuordnung der interessierenden Peaks. Erläuterungen dazu in den folgenden Abbildungen 4 bis 7.

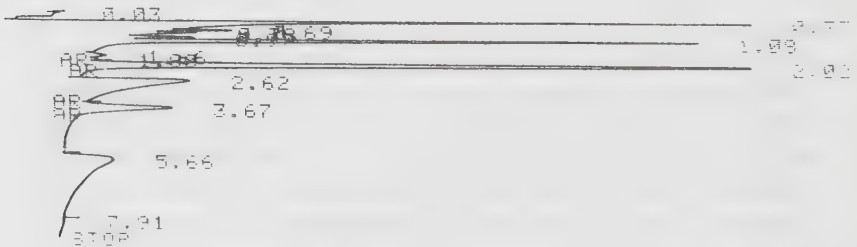


Abb. 4: Gaschromatogramm von Lösung c.

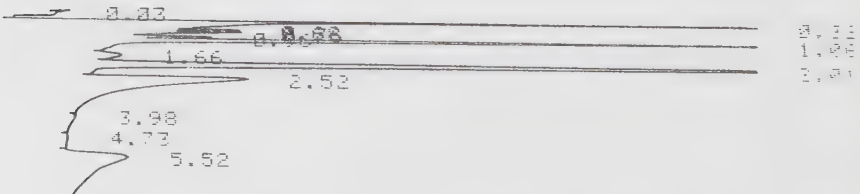


Abb. 5: Gaschromatogramm von Lösung a: Gegenüber Abb. 4 ist der Peak bei 3.67 nicht mehr registriert, d. h. 3.67 ist die Retentionszeit von Oxyäthyltheophyllin, da dieses in Lösung c, nicht aber in Lösung a enthalten ist.

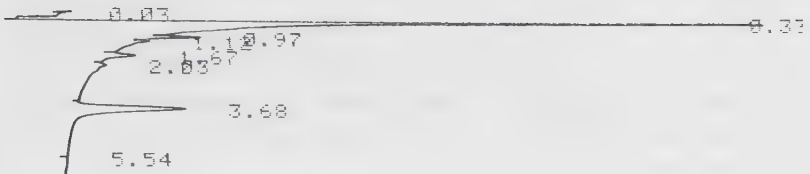


Abb. 6: Gaschromatogramm von Lösung b: Der Peak bei 3.68 ist registriert, da die Lösung Oxyäthyltheophyllin enthält. Dagegen wird der Peak bei 2.01 bzw. 2.02 aus den Abb. 4 und 5 nicht mehr aufgezeichnet; dies ist also die Retentionszeit von 6-Mercaptopurin, da diese Substanz in den Lösungen a und c, nicht aber in Lösung b enthalten ist.

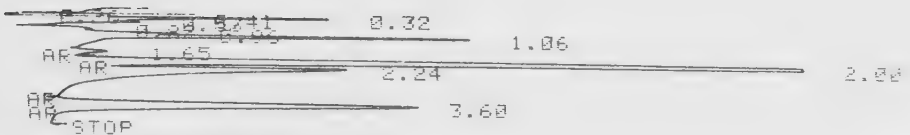


Abb. 7: Gaschromatogramm einer Extraktion von 6-Mercaptopurin aus wässriger Lösung. Die Konzentration beträgt 2 µg/ml. Peaks bei 2.00 (6-Mercaptopurin) und 3.60 (Oxyäthyltheophyllin). Wegen der besseren Übersichtlichkeit wurde die Abbildung der Wasser- einer Serumextraktion vorgezogen.

4.2. Eichkurve

Es wurde eine Eichkurve aufgestellt (Abb. 8), für die sechs verschiedene Werte von 50 bis 2000 ng/ml in einer Dreifachbestimmung aus Serum extrahiert wurden. Es wurde das Verhältnis der Integrationsflächen der Peaks von 6-Mercaptopurin und des internen Standards Oxyäthyltheophyllin berechnet und gegen die Konzentrationen des 6-Mercaptopurin aufgetragen. Der Kurvenverlauf wurde an Hand der errechneten Werte mittels linearer Regression festgelegt. Die Gleichung dieser Geraden lautet

$$y = 1,09 \cdot 10^{-3}x + 4,67 \cdot 10^{-3}.$$

Bis zu einer Konzentration von 50 ng/ml konnte einwandfrei quantifiziert werden, qualifizierbare Ergebnisse erhielt man bis etwa 20 ng/ml.

4.3. Ausbeute und Genauigkeit (Standardabweichung)

Zur Bestimmung der Ausbeute wurden Proben, die aus Serum extrahiert worden waren verglichen mit direkt derivatisierten Proben der gleichen Konzentration (unter Zusatz von 50 μ l DTE-Lösung). Der Unterschied betrug 20%, d. h. die Ausbeute der beschriebenen Methode ist 80% (Mittelwert).

Zur Ermittlung der Standardabweichung wurden acht Proben mit einer Konzentration von 2 μ g/ml extrahiert. Bei einem Mittelwert von 1,9 μ g/ml ergibt sich eine Standardabweichung von $\pm 0,2$. Der dazugehörige Variationskoeffizient beträgt $\pm 10,5\%$.

Fläche Peak 6-MP
Fläche Peak Standard

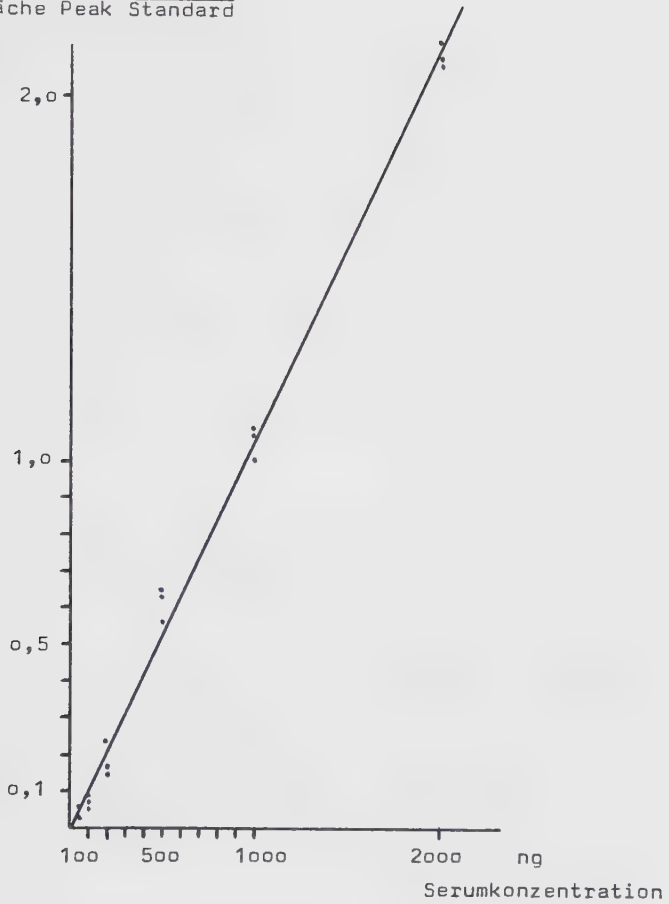


Abb. 8: Eichkurve (lineare Regression)

$$y = 1,09 \cdot 10^{-3}x + 4,67 \cdot 10^{-3}.$$

4.4. Ergebnisse des untersuchten Patientenblutes

Um die klinische Anwendbarkeit der Methode nachzuweisen, wurde sie bei acht Nierentransplantationspatienten des Transplantationszentrums München, im Klinikum Großhadern, die mit Azathioprin behandelt worden waren, erprobt. Wegen der renalen Anämie dieser Patienten - Hämatokritwerte von 15-25% und ein Hämoglobin von 6-8 g% sind die Regel (26) - war es nicht möglich größere Blutmengen abzunehmen und Doppelbestimmungen der zu untersuchenden Werte durchzuführen. Um die Patienten zu schonen und vor weiterer Verschlechterung des Blutbildes zu schützen, wurden jeweils Einfachbestimmungen gemacht.

Analysiert wurde das Blut von frisch transplantierten Patienten, die eine einmalige intraoperative Dosis Azathioprin i. v. erhalten hatten. Die Blutproben wurden vor der Operation (Nullwert), 15, 60 und 120 Minuten nach Gabe des Medikamentes abgenommen, das Serum abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Tabelle 1 zeigt die pharmakologisch relevanten Daten der untersuchten Patienten, soweit vorhanden.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Abbildung 9 zeigt das Chromatogramm einer Patientenuntersuchung: 6-Mercaptopurin wird bei 2.01, Oxyäthyltheophyllin bei 3.56 registriert. Zur Flächenbestimmung wurde von Peak-tal zu Peak-tal integriert.

Fläche Peak 6-Mercaptopurin = 1007000 Einheiten.

Fläche Peak Oxyäthyltheophyllin = 8368000 Einheiten.

Das Verhältnis dieser Peakflächen beträgt 0,12, das entspricht einer Konzentration von 106 ng/ml (Wert nach 15 Minuten).

Die ermittelten Serumkonzentrationen wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 10). Aus dieser Kurvenschar lassen sich die in Tabelle 3 aufgelisteten Halbwertszeiten für die erste Stunde errechnen.

Tabelle 1

Patient	Dosis in mg	Gewicht in kg	ges. Eiweiß in g/100 ml	Flüssigkeitsbilanz intra op. in ml
A	300	65	7,05	Einfuhr: 2500 krist. Lsg. Ausfuhr: 500 Blutverlust 700 Urin
B	300	73	6,6	Einfuhr: 2000 krist. Lsg. 250 Plasma PPL 500 Vollblut Ausfuhr: 400 Blutverlust
C	200	65,6	6,5	Einfuhr: 500 krist. Lsg. 500 Plasma 500 Vollblut Ausfuhr: ?
D	300	75	6,8	Einfuhr: 1100 krist. Lsg. 750 Plasma Ausfuhr: 400 Blutverlust
E	300	56,6	5,8	Einfuhr: 3000 krist. Lsg. 1900 Plasma 500 Vollblut Ausfuhr: 1300 Blutverlust
F	300	65	6,2	Einfuhr: 100 krist. Lsg. 100 kolloid. Lsg. 600 Plasma Ausfuhr: 200 Blutverlust
G	keine Daten verfügbar			
H	300	63,5	6,98	Einfuhr: 1000 krist. Lsg. Ausfuhr: 300 Blutverlust

Tabelle 2

Patient	Wert nach 15 Minuten in ng/ml	60 Min.	120 Min.
A	880	142	108
B	106	70	-
C	155	25	nachweisbar
D	287	70	nachweisbar
E	465	215	190
F	74	nachweisbar	nachweisbar
G	700	380	170
H	nicht quantifizierbar, da Standard-peak Überlagert	112	nachweisbar

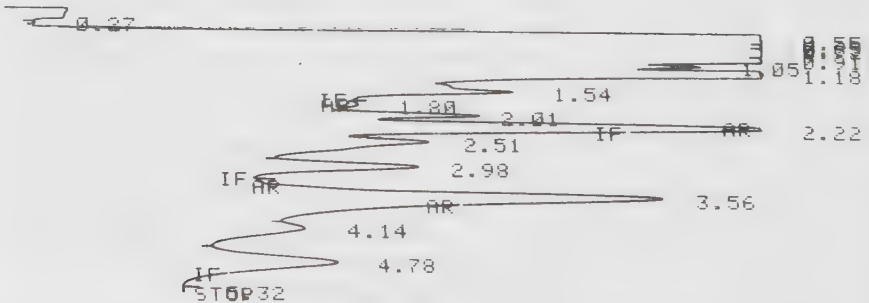


Abb. 9: Chromatogramm des Patienten B, 15 Minuten nach i. v. Gabe des Azathioprin.

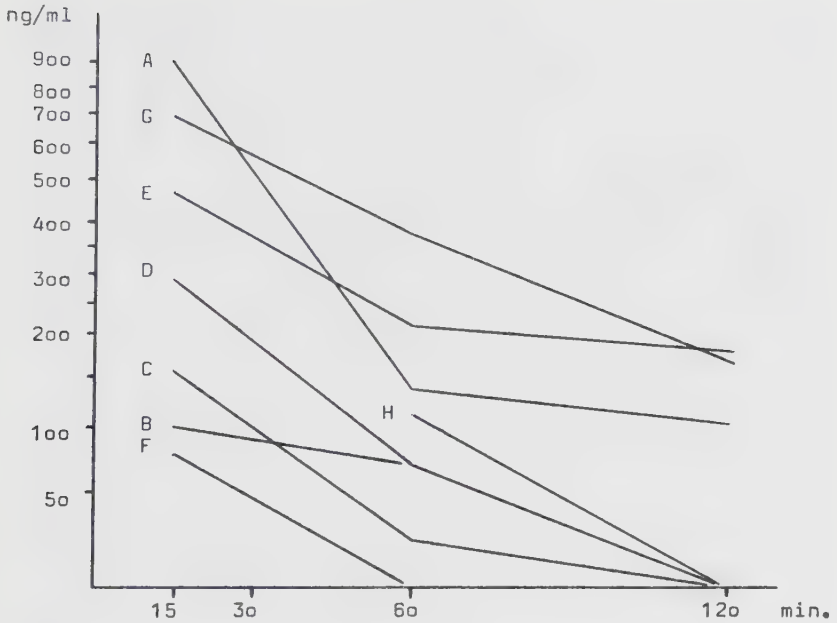


Abb. 10: Kurvenschar der ermittelten Meßwerte (halblogarithmisch).

Tabelle 3

Patient	Halbwertszeit in Minuten	Patient	Halbwertszeit in Minuten
A	20	E	40
B	60 (geschätzt)	F	20
C	22	G	55
D	25	H	30 (für die 2. Stunde)

Die Halbwertszeiten wurden nur für die erste Stunde bestimmt, da für die zweite Stunde zum Teil keine exakten Werte mehr gemessen werden konnten. Eine Verlaufsbeobachtung des Serumspiegels während der ersten 60 Minuten nach i. v. Gabe des Azathioprin ist also durchaus möglich. Die Halbwertszeiten bewegen sich hier zu einem großen Teil im Bereich zwischen 20 und 40 Minuten. Auch die nicht ermittelbare Halbwertszeit des Patienten H dürfte in diesem Bereich liegen: da die Halbwertszeiten im zweiten Intervall größer sind als im ersten und die des Patienten H in der zweiten Stunde 30 Minuten beträgt, kann man etwa 20 bis 25 Minuten für die Halbwertszeit der ersten Stunde annehmen.

Die hohen Halbwertszeiten der Patienten B und G können auf zufällige Fehler oder auf Nierenversagen zurückgeführt werden, wobei ersteres eher auf B (niedrige Serumspiegel) und die an zweiter Stelle genannte Ursache eher auf G (hohe Serumspiegel) zutrifft. Diese Patientenuntersuchungsreihe kann über Nierenversagen und damit gekoppelte Schäden keine Auskunft geben, da hierfür größere Kollektive untersucht werden müssen. Sie soll lediglich die Anwendbarkeit der erarbeiteten Methode in der Klinik am Patienten beweisen, was damit auch gelungen ist.

Ähnliche Werte für Halbwertszeiten von 6-Mercaptopurin im Serum findet man in der Literatur bei LOO u. a. (36): es werden durchschnittliche Halbwertszeiten von 21 Minuten für Kinder und 47 Minuten für Erwachsene angegeben.

Diese Literaturstelle beschreibt eine Methode zur quantitativen 6-Mercaptopurinbestimmung, bei welcher mit Hilfe von Bratton-Marshall-Reagens gebildeter Azofarbstoff farbphotometrisch nachgewiesen wird. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt ebenso wie in der Arbeit von BAILEY u. a. (4) bei 200 ng/ml, was für unsere Belange nicht ausreichend ist. Darüber hinaus muß die Frage gestellt werden, ob bei dieser Methode wirklich nur das 6-Mercaptopurin zu Azofarbstoff reagiert, oder ob nicht auch andere Stoffwechselprodukte in die Reaktion mit einbezogen werden und auf diese Weise die Ergebnisse verfälschen.

Anders scheint es sich mit Azathioprin selber zu verhalten: BACH und DARDENNE (1) beschreiben Halbwertszeiten von viereinhalb Stunden, die mit der oben erwähnten biologischen Methode ermittelt wurden.

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, daß diese Halbwertszeit von viereinhalb Stunden während Hämodialyse merklich absinkt auf zweieinhalb Stunden (49). Dieser rasche Abfall ist besonders stark in den ersten 30 Minuten und wird zurückgeführt auf die hohen Konzentrationsgradienten zwischen Plasma und Dialysat, sowie auf die relativ geringe Plasmaproteinbindung des Azathioprin von 30% (49). Dies bedeutet, daß bei anfänglichem Nierenversagen nach Transplantationen, bedingt durch Gewebsischämie der Niere vor ihrer Verpflanzung, trotz optimaler Azathioprindosis durch Hämodialyse eine Kummulation der toxischen Substanzen im Organismus verhindert werden kann.

5. Arbeitsvorschriften

Vorschrift 1

1 ml einer 6-Mercaptopurinlösung (10 mg 6-MP in 79,5 g Methanol) wird mit 100 μ l Propionsäureanhydrid versetzt und im Wasserbad bei 60°C abgedampft. Der Rückstand wird in 100 μ l Pyridin aufgenommen; nach erneutem Abdampfen wird der verbleibende Rückstand in 1 ml Äthanol aufgelöst.

2 μ l werden in den Gaschromatographen gespritzt.

Säulentemperatur	250°C
Einspritztemperatur	250°C
Detektortemperatur	300°C
Säulenmaterial	Ultrapond

Vorschrift 2

0,5 ml der in Vorschrift 1 beschriebenen 6-Mercaptopurinlösung werden mit 0,5 ml einer 0,01 M Trimethylaniliniumhydroxidlösung (Herstellung siehe Vorschrift 6) versetzt.

2 μ l werden in den Gaschromatographen gespritzt.

Säulentemperatur	230°C
Einspritztemperatur	200, 210, 220, ... 300°C
Detektortemperatur	300°C
Säulenmaterial	Ultrapond

Vorschrift 3

30 ml einer 6-Mercaptopurinlösung 1:100 verdünnt in destilliertem Wasser und 5 g XAD-4 Harz werden 5 bis 10 Minuten im Heidolphrüttler geschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen, und das XAD-4 Harz mit destilliertem Wasser gewaschen. Sodann wird mit 50 ml Methanol (Variante: Äthylacetat-dichloräthan) eluiert, und das Eluat im Sample Concentrator bei 70°C eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 2 mal 0,5 ml Methanol aufgelöst, erneut abgedampft und mit 250 μ l 0,01 M Trimethylaniliniumhydroxid derivatisiert.

2 μ l werden in den Gaschromatographen gespritzt.

Säulentemperatur	230°C
Einspritztemperatur	300°C
Detektortemperatur	300°C
Säulenmaterial	Ultrapond

Vorschrift 4

a) 20 ml einer 6-Mercaptopurinlösung 1:100 verdünnt in destilliertem Wasser werden in eine Extrelut^R-Fertigsäule gegeben. Nach Verteilung der Probe im Trägermaterial der Säule (ca. nach 10 Minuten) wird mit 40 ml Methanol (Variante: Äthylacetat-dichloräthan 60/40) eluiert, das Eluat eingedampft, und der Rückstand in 500 µl 0,01 M Trimethylaniliniumhydroxid gelöst.

2 µl werden in den Gaschromatographen gespritzt.

Bedingungen siehe Vorschrift 3.

b) 20 ml einer Lösung bestehend aus
4 ml Vollblut (antikoaguliert mit 2 Tropfen Liquemin^R),
0,2 ml 6-Mercaptopurinlösung (siehe Vorschrift 1) und
15,8 ml destilliertem Wasser
werden in eine Extrelut^R-Fertigsäule gegeben (vergleiche Vorschrift 4a).

Es wird eluiert mit 40 ml

Methanol bzw.

Dichlormethan/Isopropanol 85/15 bzw.

Chloroform/Methanol 75/25 bzw.

Äther/Äthanol 75/25 bzw.

Toluol.

Das Eluat wird eingedampft, weiteres Vorgehen siehe Vorschrift 4a.

Vorschrift 5

Ein Plastiksäulchen, das mit Dowex-Kationenaustauschharz gefüllt ist, wird an beiden Enden mit Glaswolle verschlossen. Die so hergestellte Säule wird mit 1 N Salzsäure angesäuert. In die Säule werden nun 4 ml einer mit 0,05 ml konzentrierter HCl angesäuerten 6-Mercaptopurinlösung 1:100 verdünnt in

destilliertem Wasser gegeben. Es wird mit 20 ml 25%-igem Ammoniak eluiert. Das Eluat wird ebenfalls mit konzentrierter HCl angesäuert, auf eine XAD-2 Säule gegeben und mit ca. 40 ml destilliertem Wasser gewaschen. Nun wird mit 15 ml Methanol eluiert und das Eluat eingedampft. Der Rückstand wird für die Gaschromatographie in 500 μ l 0,01 M Trimethylaniliniumhydroxid gelöst; 2 μ l werden in den Gaschromatographen gespritzt (Bedingungen siehe Vorschrift 3).

Für die Spektrophotometrie wird der Rückstand in 1 bis 2 ml 25%-igem Ammoniak gelöst und gegen reinen 25%-igen Ammoniak gemessen.

Vorschrift 6

Verwendete Reagentien

6-Mercaptopurin

Oxyäthyltheophyllin

Äthanthiol

Dithioerythrit (DTE)

Phenyltrimethylammoniumbromid

Silberoxid

di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat

Kaliumdihydrogenphosphat

Zubereitung der Lösungen

10 mg 6-Mercaptopurin werden in 79,5 g Methanol gelöst. Dies ergibt eine Lösung von 0,1 mg/ml. Da 6-Mercaptopurin lichtempfindlich ist (28), sollte diese Lösung in Flaschen mit lichtundurchlässigem Glas aufbewahrt werden.

1 mg Oxyäthyltheophyllin wird in 100 ml Methanol (79,5 g) gelöst. Dies ergibt eine Lösung von 0,01 mg/ml.

Beide Lösungen werden im Kühlschrank bei etwa 4°C aufbewahrt und sind mehrere Monate haltbar (4).

Äthanthiolhaltige Lösungen (0,1%) werden von Methanol, Chloro-

form, Äthylacetat sowie von Isopropanol/Äthylacetat (1/1) an-
gerichtet. Ihre Haltbarkeit beträgt bei -20°C nur einige Wo-
chen (4), weshalb keine zu großen Vorräte angelegt werden
sollten. Es muß eindringlich darauf hingewiesen werden, daß
diese Lösungen stark geruchsbelästigend sind. Es empfiehlt
sich deshalb, sie dicht verschlossen zu halten und die Arbeits-
gänge in einem Abzug durchzuführen.

DTE-Lösungen werden für jede Analyse frisch zubereitet. Benö-
tigt wird eine 1%-ige Lösung in destilliertem Wasser. DTE
wird im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Trimethylaniliniumhydroxid (TMAH) wird benötigt in einer Kon-
zentration von 0,2 M. Dazu werden 5 g Silberoxid und 4,75 g
Phenyltrimethylammoniumbromid in 100 ml Methanol 30 Minuten
verrührt, und die methanolische Lösung abfiltriert. TMAH
wird ebenfalls bei -20°C gelagert; die Haltbarkeit beträgt
mehrere Jahre (44).

Zur Herstellung von 100 ml 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 6
werden 12,1 ml 0,5 M di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydratlö-
sung (1,7799 g Substanz in 20 ml Aqua dest.) und 87,9 ml
0,5 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung (6,8045 g Substanz in
100 ml Aqua dest.) miteinander vermischt. Die Pufferlösung
ist in lichtgeschützten Flaschen bei Raumtemperatur mehrere
Monate haltbar (44).

Arbeitsgeräte

Benötigt werden ein Heidolph-Rüttler, ein Wasserbad zum Ein-
dampfen der Proben, eine Zentrifuge sowie eine Heizplatte
mit Alublock für den Derivatisierungsvorgang.

Gaschromatograph

Verwendet wurde ein Hewlett-Packard Modell hp 5840 A mit Flä-
chenintegrator und Stickstoff-Flammenionisationsdetektor.
Folgendes Säulenmaterial erwies sich am geeignetsten:
3% SP 2250 DA on 100/200 Supelcoport (Fa. SUPELCO, Inc.,
Pennsylvania).

Die Säulenlänge beträgt 4 ft. entsprechend 1,20 m. Die Säule wird an beiden Enden von einigen Zentimetern Glaswolle verschlossen. Die Säulentemperatur darf 250°C nicht überschreiten.

Folgende Arbeitsbedingungen erwiesen sich als optimal:

Säulentemperatur 220°C

Einspritztemperatur 300°C

Detektortemperatur 300°C

Fließgeschwindigkeit des Trägergases (H_2) ca. 20 ml/min.

Das Integrationsverfahren für die interessierenden Peaks (6-Mercaptopurin und Oxyäthyltheophyllin) wurde dem jeweiligen Chromatogramm angepaßt:

Beispiel 1



In diesem Fall empfiehlt es sich, die Tangente zur Berechnung der Peakfläche (schraffiert) von Peaktal zu Peaktal (Pfeile) anzulegen.

Beispiel 2



Hier ist es von Nutzen, die Tangente in gezeigter Weise zum nächsten Peaktal anzulegen und vom gewünschten Peak das Lot zu ziehen. Beispiel 1 würde bei dieser Situation das Ergebnis verfälschen.

Das erforderliche Programm kann dem dem Gaschromatographen

angeschlossenen Integrator jederzeit eingegeben werden.

Extraktionsmethode

- (A) 2 ml Serum bzw. 2 ml 6-Mercaptopurinlösung enthaltendes Aqua dest. werden in ein dicht verschließbares, zentrifugenfestes Reagenzglas pipettiert und 0,2 ml DTE-Lösung hinzugefügt. Das Reagenzglas sollte gut 10 ml aufnehmen können. O. g. Mischung wird mit Ammoniumkarbonat gesättigt, um für die nun folgende Extraktion ein alkalisches Milieu zu schaffen.
- (B) Nun werden 8 ml der 0,1%-igen Äthanthiollösung in Äthylacetat/Isopropanol (1/1) dazugegeben; das Reagenzglas wird gut verschlossen und 5 Minuten im Rüttler geschüttelt. Daraufhin wird die Probe 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues zentrifugenfestes Reagenzglas überführt und im Wasserbad bei ca. 60°C eingedampft. Die Wände des Glases werden nun mit 0,5 ml 0,1%-iger Äthanthiollösung in Methanol und 0,5 ml 0,1%-iger Äthanthiollösung in Chloroform gewaschen und die Lösung wiederum eingedampft.
- (C) Der nach dem Eindampfen verbleibende Rückstand wird jetzt in 0,4 ml 1 M Kochsalzlösung aufgenommen und mit 0,05 ml 0,2 M Salzsäure für die weiteren Arbeitsgänge angesäuert. Sodann erfolgt die Reinigung der Lösung: Nach Zusetzen von 1 ml äthanthiolhaltigem Chloroform (0,1%) wird die Lösung 30 Sekunden im Rüttler geschüttelt und 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Reagenzglas kurz (2 bis 3 Minuten) ins Wasserbad gehalten und gleichzeitig vorsichtig gedreht; dabei gehen unlösliche Substanzen in die Chloroformphase über, die verworfen werden kann. Dieser Vorgang muß solange wiederholt werden bis die zurückbleibende Lösung wasserklar geworden ist. Bei experimentellen Wasserextraktionen genügen drei Reinigungsgänge. Es ist hierbei sorgfältigstes Arbeiten notwendig, um nicht zu große Verluste der zu extrahierenden Substanz (6-Mercaptopurin) zu erleiden.

- (D) Die zuvor angesäuerte wässrige Lösung, die nun gereinigt ist, wird mit 0,2 ml 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 6 neutralisiert. Es erfolgt die zweite Extraktion: 5 ml 0,1%-iges Äthanthiol in Äthylacetat werden dazugegeben, das Reagenzglas fest verschlossen und 20 Sekunden auf dem Rüttler geschüttelt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren wird der Überstand in ein neues 10 ml Reagenzglas, das 2 µg Oxyäthyltheophyllin als Standard enthält gegeben. Die verbleibende wässrige Lösung wird in gleicher Weise ein zweites Mal extrahiert und der Überstand zum ersten hinzugegeben. Etwaiges sich im Äthylacetat befindendes Wasser wird mit ca. 500 mg wasserfreiem Natriumsulfat gebunden, und das so getrocknete Äthylacetat in ein neues Reagenzglas dekantiert und im Wasserbad eingedampft.
- (E) Die eingedampften Substanzen werden in 0,2 ml Methanol aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt, das 10 µl 0,2 M Trimethylaniliniumhydroxidlösung enthält. Nun erfolgt die Derivatisierung im Alublock bei 135°C während 30 Minuten. Das Reagenzglas muß dabei absolut dicht verschlossen sein, da ansonsten die Gefahr besteht, daß die gelösten Substanzen entweichen. Nach Abkühlung wird das Methanol abgedampft und die verbleibenden Substanzen in 20 µl Methanol gelöst. 2 µl davon werden in den Gaschromatographen gespritzt.

6. Diskussion

Die oben beschriebene Methode ermöglicht es den Serumspiegel von 6-Mercaptopurin bei Nierentransplantationspatienten, die Azathioprin erhalten haben zu bestimmen.

Wir sind der Ansicht, daß aus der Kenntnis des Serumspiegels eines Azathioprinmetaboliten, wie ihn 6-Mercaptopurin darstellt, therapeutische Konsequenzen gezogen werden können, um unerwünschte Schädigungen des Organismus zu verhindern (35). Wir stehen mit dieser Ansicht im Gegensatz zu ELION. ELION kommt nämlich zu dem Schluß, daß die Plasmabestimmung von Azathioprin oder seiner Metaboliten keinen prognostischen Wert hinsichtlich des therapeutischen Nutzens dieser Substanz besitzt, da die Metaboliten lange aus dem Blut verschwunden sein können, bevor Wirkungen und Nebenwirkungen auftreten (25). Wir aber meinen, daß erhöhte Serumspiegel ein erster ernstzunehmender Hinweis auf Nierenversagen und daraus resultierende Schädigungen sein können und von uns deshalb in einem verstärkten Maß beachtet werden sollten.

Zu diesem Zweck wurde eine von BAILEY u. a. (4) beschriebene Methode modifiziert, die dadurch für unsere Belange erst durchführbar wurde. Es wurde nicht nur die Nachweisgrenze um den Faktor 10 verbessert, die Methode ließ sich auch in der Klinik am Patienten durchführen, was BAILEY u. a. (4) offensichtlich nicht gelang. Sie versuchten ihre Methode bei Patienten anzuwenden, die mit 6-Mercaptopurin behandelt worden waren. Bei 12 untersuchten Patienten konnte nur bei einem einzigen ein Serumspiegel von 300 ng/ml ermittelt werden. Bei den übrigen 11 Patienten ließ sich kein 6-Mercaptopurin nachweisen. Eigene Untersuchungen an 8 Patienten, die mit Azathioprin behandelt worden waren, brachten jedoch bei allen Probanden Ergebnisse, die eine Quantifizierung der Serumspiegel erlaubten.

Die weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet besteht nun darin, ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen und dabei besondere Rücksicht auf Fälle mit verminderter Nieren-

funktion zu nehmen; bei diesen wäre es dann angebracht, entweder die Dosis zu verringern oder sie der Hämodialyse zuzuführen.

Für eine routinemäßige Durchführung ist diese Methode allerdings kaum geeignet, da ein großer Zeit- und Personalaufwand hierfür nötig wäre. Sie sollte deshalb für gefährdete Patienten beschränkt bleiben. Auch wäre es eventuell möglich, für eine Transplantation in Frage kommende Patienten einem präoperativen Test mit Azathioprin zu unterziehen und an Hand des Serumspiegels und des Blutbildes das jeweilige Verhalten zu interpretieren und für die postoperative Therapie die nötigen Konsequenzen zu ziehen.

Darüberhinaus ist für die Zukunft anzustreben die Methodik weiter zu verbessern, d. h. vorallem die Komponente Zeit zu verkürzen. Auch wäre es vielleicht möglich mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie die Nachweisgrenze weiter herabzusetzen, um noch präzisere Ergebnisse zu erhalten. Das 6-Mercaptopurin könnte hiermit eventuell ohne vorhergehende Derivatisierung direkt gemessen werden, was den Zeitfaktor der Methode verkürzen würde und gleichzeitig Substanzverluste, bedingt durch die mit vielen Reagenzglaswechseln verbundenen Arbeitsgänge geringer halten könnte.

7. Zusammenfassung

Das bei Organtransplantationen verwendete Immunsuppressivum Azathioprin (Imurek^R), ein Antimetabolit hat viele Nebenwirkungen, speziell Knochenmarksaplasien besonders bei Nierenversagen. Deshalb war es notwendig einen Serumnachweis für Azathioprin bzw. seinen Metaboliten 6-Mercaptopurin zu schaffen um die immunsuppressive Therapie überwachen zu können.

Zu diesem Zweck wurde eine vorliegende Arbeit von BAILEY u. a. verbessert, wobei die Nachweisgrenze um den Faktor 10 gesteigert werden konnte. Serum wird mit Dithioerythrit (DTE) behandelt und mit Ammoniumkarbonat gesättigt. Das 6-Mercaptopurin wird dann aus dem Serum extrahiert mittels Isopropanol/Äthylacetat (1/1), das 0,1% Äthanthiol enthält. Der nach dem Eindampfen verbleibende Rückstand wird in angesäuerter Kochsalzlösung aufgenommen, mit Chloroform gewaschen und mit Äthylacetat erneut extrahiert. 6-Mercaptopurin wird dann mittels Trimethylaniliniumhydroxid derivatisiert und gaschromatographisch gemessen. Die Substanzen DTE und Äthanthiol sind notwendig um die Zersetzung des 6-Mercaptopurin zu verhindern; außerdem bewirken sie einen sogenannten Wandschutzeffekt. Als interner Standard für die gaschromatographische Messung wurde Oxyäthyltheophyllin verwendet. Die Ausbeute der Methode beträgt 80%, die Nachweisgrenze liegt bei 20 ng/ml.

Die Methode wurde bei acht Patienten, die mit Azathioprin behandelt worden waren angewendet, wobei die Halbwertszeiten in dem Zeitraum von 15 und 60 Minuten nach i. v. Gabe des Medikamentes 20 bis 40 Minuten betrugen.

Summary

The most used immunosuppressive drug, azathioprine (Imuran^R), an antimetabolite, shows many side effects especially aplasia of bone marrow when kidney function is low. For this reason it was necessary to create a method for measuring azathioprine respectively its metabolite 6-mercaptopurine in serum.

This was done by improving a present work of BAILEY e. a.. Serum samples containing the drug were treated with dithioerythritol and saturated with ammonium carbonate. 6-mercaptopurine was then extracted from the serum with a mixture of isopropanol-ethyl acetate (1:1 v:v) containing 0,1% ethanthiol. The solvent was evaporated, the residue dissolved in dilute hydrochloric acid, washed with chloroform and extracted with ethyl acetate. 6-mercaptopurine was derivatized with trimethylaniliniumhydroxide and measured gaschromatographically. Dithioerythritol and ethanthiol were added to prevent the decomposition of 6-mercaptopurine, furthermore they protect the drug from adhering to the wall of the glass. Oxyethyltheophylline was used as the internal standard during the gaschromatographic analysis. The extraction and clean-up method recovered 80% of the 6-mercaptopurine present, the lower limit of sensitivity was 20 ng/ml, so that it's ten times lower than in the present work of Bailey e. a..

The method could be realized on eight patients treated with azathioprine; the half life of the drug was about 20 to 40 minutes within the first hour after application.

8. Literaturverzeichnis

- (1) BACH, J. F., DARDENNE, H., Transplantation 12, 253-259 (1971)
- (2) BACH, J. F., DARDENNE, H., BACH, M. A., Presse medicale 35, 2293 (1972)
- (3) BACH, J. F., DARDENNE, H., FOURNIER, C., Nature 222, 998 (1969)
- (4) BAILEY, D. G., WILSON, T. E., JOHNSON, G. E., J. of chromatography 111, 3o5 (1975)
- (5) BAUER, K. H., Beiträge Klin. Chir. 141, 442 (1927)
- (6) BILLINGHAM, E. R., KROHN, P. L., MEDAWER, P. B., Br. med. J. 1, 1157 (1951)
- (7) CALNE, R. Y., Lancet 1, 417 (196o)
- (8) CALNE, R. Y., Renal transplantation 145, Edward Arnold Ltd. London (1967)
- (9) CALNE, R. Y., ALEXANDRE, G. P. J., MURRAY, J. E., Ann. N. Y. Acad. Sci. 99, 743 (1962)
- (1o) CALNE, R.Y., MURRAY, J. E., Surg. Forum 12, 118 (1961)
- (11) CHALMERS, A. H., KNIGHT, P. R., ATKINSON, M. R., Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 45, 681 (1967)
- (12) CHALMERS, A. H., KNIGHT, P. R., ATKINSON, M. R., Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 47, 263 (1969)
- (13) CERRI, O., MAFFI, G., Boll. Chim. Farm. 1oo, 94o (1961)
- (14) COFFEY, J. J., WHITE, C. A., LESK, A. B., ROGERS, W. I., SERPICK, A. A., Cancer Res., 32, 1283 (1972)
- (15) EGGER, G., ACKMAN, D., Experientia (Basel) 27, 326 (1971)
- (16) ELION, G. B., Fed. Proc. 26, 898 (1967)
- (17) ELION, G. B., Diskussion. In: Mielscher, P. A., Grabor, P. (Eds.): International symposium of immunopathology, Fifth, Italy, June 1967 399-4o1. New York: Grune and Stratton 1968

- (18) ELION, G. B., Proc. roy. Soc. Med. 65, 257-260 (1977)
- (19) ELION, G. B., BIEBER, S., HITCHINGS, G. H.,
Cancer Chemother. Rep. 8, 36 (1960)
- (20) ELION, G. B., CALLAHAN, S., BIEBER, S., HITCHINGS, G. H.,
RUNDLES, R. W., Cancer Chemother. Rep. 14, 93 (1961)
- (21) ELION, G. B., CALLAHAN, S., HITCHINGS, G. H., RUNDLES,
R. W., LASZLO, I., Cancer Chemother. Rep. 16, 197 (1962)
- (22) ELION, G. B., CALLAHAN, S., NATHAN, H., BIEBER, S.,
RUNDLES, R. W., HITCHINGS, G. H., Biochem. Pharmacol.
12, 85 (1963)
- (23) ELION, G. B., CALLAHAN, S., RUNDLES, R. W., HITCHINGS,
G. H., Cancer Res. 23, 1207 (1963)
- (24) ELION, G. B., HITCHINGS, G. H., VANDERWERFT, I.,
Biol. Chem. 192, 505 (1951)
- (25) ELION, G. B., HITCHINGS, G. H., Handbook of Exp. Pharma-
cology, Satorelli, A. C., Johns, D. G. (Eds.),
New Series, 38, 2, 404-425 (1975)
- (26) ENDERLIN, F., HARDER, F., in Chirurgie Hrsg. Allgöwer,
M., 3. Auflage, 519 (1976)
- (27) FINKEL, J. M., Anal. Biochem. 27, 362 (1967)
- (28) HAGERS Handbuch der Pharm. Praxis,
Hrsg.: List, P. H., Hörhammer, L., 5. Band, 789 (1976)
- (29) HAMBURGER, J., COLL, J. R., Phycns. London 4, 125 (1970)
- (30) HAMBURGER, J., CROSNIER, J., DORMONT, J., BACH, J. F.,
Renal transplantation. Theory and practice. Baltimore:
Williams and Willkins (1972)
- (31) HAMILTON, L., ELION, G. B., Ann. N. Y. Acad. Sci. 60,
304 (1954-1955)
- (32) HEBERER, G., LAND, W., in Organtransplantationen,
Hrsg.: Bayr. Landesärztekammer 7 (1979)
- (33) HITCHINGS, G. H., ELION, G. B., Acts. Chem. Res. 2,
202 (1969)

- (34) HUME, D. M., Human transplantation, Ed. Rapaport and Dausset, Grune and Stratton, New York and London (1968)
- (35) LAND, W., SCHILLING, A., Pers. Mitteilung über klin. Untersuchungen (1978)
- (36) LOO, T. E., LUCE, J. K., SULLIVAN, M. P., FREI, E., Clin. Pharmacol. Ther. 9, 180 (1968)
- (37) MARCHIORI, T. L., AXTELL, H. K., LA VIA, M. F., WADDELL, W. R., STARZL, T. E., Surgery 55, 412 (1964)
- (38) MEDAWER, P. B., J. Anat. 78, 176 (1944)
- (39) MEDAWER, P. B., J. Anat. 79, 157 (1945)
- (40) MEDAWER, P. B., Br. J. exp. Path. 27, 9 (1946)
- (41) MELLETT, L. B., Clin. Pharmacol. Ther. 16, 230 (1974)
- (42) MERRILL, J. P., Human transplantation, Ed. Rapaport and Dausset, Grune and Stratton, New York and London (1968)
- (43) MERRILL, J. P., MURRAY, J. E., HARRISON, J. H., FRIEDMAN, E. A., DEALY, J. B., DAMMIN, G. J., New Engl. J. Med. 262, 1251 (1960)
- (44) v. MEYER, L., WYPIOR, H. J., eigene Beobachtungen (1978-1980)
- (45) MICHAEL, A. F., VERNIER, R. L., DRUMMOND, K. N., LEVITT, J. P., HERDMANN, R. C., FISH, A. J., GOOD, R. A., New Engl. J. Med. 276, 817 (1967)
- (46) MORGAN, J. A., Surgery 30, 306 (1951)
- (47) PLETKA, P., COHEN, S. L., HULME, B., KENYON, J. R., OWEN, K., THOMSON, A. E., SUELL, M., MOWBRAY, J. F., PORTER, K. A., LEIGH, D. A., PEART, W. S., Lancet I, 1 (1969)
- (48) SACHS, A., KÜPPERS, B., in Diagnostika MERCK, Extrelut^R
- (49) SCHUSZIARRA, V., ZIEKURSCH, V., SCHLAMP, R., SIEMENSEN, H. C., Int. J. Clin. Pharmacol. 14/4, 298 (1976)
- (50) SCHWARTZ, R., DAMESHEK, W., Nature 183, 1682 (1959)

- (51) SCHWARTZ, R., STACK, J., DAMESHEK, W.,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 164 (1958)
- (52) STARZL, T. E., Experience in renal transplantation,
Philadelphia: W. B. Saunders (1964)
- (53) STARZL, T. E., Experience in hepatic transplantation,
W. B. Saunders (1969)
- (54) STARZL, T. E., GROTH, G. C., BRETTSCHEIDER, L., SMITH,
G. V., KASHIWAGI, N., Antibiotica Chemotherapy 15,
349 (1969)
- (55) STARZL, T. E., MARCHIOVO, T. L., ZUHLKE, V., BRETT-
SCHNEIDER, L., Med. Times 95, 196 (1967)
- (56) SUNDERMAN, C. R., PERSON, H. A., J. Pediat. 75,
1058 (1969)
- (57) WALLE, T., EHRSSON, H., Acta Pharm. Suecia 8, 27 (1971)
- (58) WILLIAMSON, C. S. J. Urology 16, 231 (1926)
- (59) WILLMANNS, W., in Verhandlungen der Dt. Gesellschaft
für Innere Medizin, 83. Band 773 (1977)
- (60) WOODRUFF, M. F. A., NOLAN, B., ROBSON, I. S.,
MAC DONALD, M. K., Lancet I, 6 (1969)

Lebenslauf

19. 12. 1955 geboren in Schwandorf/Bayern als einziges Kind des Ingenieurs Josef Wypior und dessen Ehefrau Hildegard, geb. Eichler.
- 1962 Eintritt in die Luitpold-Volksschule in Amberg.
- 1966 Übersiedelung nach Landshut und Übertritt in das dortige Hans-Carossa-Gymnasium.
- 1975 erfolgreich absolvierte Reifeprüfung am o. g. Gymnasium.
Beginn des Hochschulstudiums an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
- 1977 Ärztliche Vorprüfung.
- 1978 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung.
Aufnahme der Arbeiten am Institut für Rechtsmedizin der Universität München.
- 1980 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung.
- 1981 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung.

